昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2018, 61(9): 1019 – 1028　　doi:10.16380/j.kcxb.2018.09.003

漆酶-1 基因在烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱中的表达模式比较

杨春红[1,2]，郭建洋[2]，褚　栋[1]，程登发[2,*]，万方浩[1,2,3,*]

(1. 青岛农业大学植物医学学院，山东青岛 266109；
2. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
3. 中国农业科学院(深圳)农业基因组研究所，广东深圳 518120)

摘要：【目的】漆酶-1(LAC1)在粉虱-植物互作中发挥重要作用，本研究旨在探讨烟粉虱 *Bemisia tabaci* MEAM1 隐种和温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* 两种存在竞争关系的粉虱中 LAC1 基因表达模式是否存在差异。【方法】测定烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱唾液漆酶-1 活力；对温室粉虱 *LAC*1 基因进行了克隆和测序；通过荧光定量 PCR 测定和比较了 *LAC*1 在两种粉虱不同发育阶段和成虫不同组织中的表达谱以及取食外施水杨酸(0.5 mmol/L)的番茄植株后两种粉虱不同发育阶段和成虫不同组织中 *LAC*1 的表达水平，同时检测了成虫存活率和产卵量。【结果】酶活力测定结果表明两种粉虱的唾液中漆酶-1 活力差异不显著。温室粉虱 PCR 扩增后得到大小 639 bp 的 *LAC*1 基因中间片段。发育表达谱结果表明，*LAC*1 基因在两种粉虱各个发育阶段均有表达，在烟粉虱 MEAM1 隐种成虫期表达量逐渐升高，而在温室粉虱各发育时期的表达量无显著差异；烟粉虱 MEAM1 隐种成虫期 *LAC*1 的表达量高于温室粉虱。组织表达结果表明，*LAC*1 在两种粉虱成虫的头胸部、中肠和腹部残骸中均有表达，但在中肠中丰度最高。取食外施水杨酸番茄植株的烟粉虱 MEAM1 隐种，随取食时间的延长成虫存活率下降，与对照(取食喷施清水的植株)相比差异显著。羽化后 14 d 时，取食外施水杨酸植株的烟粉虱 MEAM1 隐种存活率仅为对照的一半，而取食外施水杨酸植株的温室粉虱的存活率与对照相比差异不显著。无论是取食外施水杨酸的植株还是取食对照植株，烟粉虱 MEAM1 隐种体内 *LAC*1 表达量和产卵量均高于温室粉虱。【结论】*LAC*1 在两种粉虱体内表达模式存在差异，这可能在两种粉虱的竞争适应中具有一定作用。

关键词：烟粉虱 MEAM1 隐种；温室粉虱；漆酶-1；表达谱；荧光定量 PCR

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2018)09-1019-10

Comparison of expression patterns of laccase-1 gene in *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae)

YANG Chun-Hong[1,2], GUO Jian-Yang[2], CHU Dong[1], CHENG Deng-Fa[2,*], WAN Fang-Hao[1,2,3,*]

(1. College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen, Guangdong 518120, China)

Abstract:【Aim】Laccase-1 (LAC1) plays an important role in whitefly-plant interaction. The aim of

基金项目：农业部公益性行业(农业)科研专项(201303019-02)；国家重点研发计划生物安全关键技术研发专项(2016YFC1201200)

作者简介：杨春红，女，1983 年 10 月生，山东莱芜人，博士，研究方向为农业昆虫与害虫防治，E-mail: chunhongy11@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: wanfanghao@caas.cn; dfcheng@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2017-03-14；接受日期 Accepted: 2018-02-18

this study is to explore the variations in expression patterns of *LAC*1 gene in two whitefly species, *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum*.【Methods】The laccase-1 activity was measured in the saliva of *B. tabaci* MEAM1 and *T. vaporariorum*. The LAC1 gene from *T. vaporariorum* was cloned and sequenced. The expression profiles of *LAC*1 in different developmental stages and adult tissues of the two whiteflies were assayed by qPCR and compared. The *LAC*1 expression levels, adult survival rate and the number of eggs laid by the two whiteflies after feeding on tomato plants sprayed with 0.5 mmol/L salicylic acid (SA) were detected and compared.【Results】The laccase-1 activities in saliva of *B. tabaci* MEAM1 and *T. vaporariorum* had no significant differences. A 639 bp intermediate fragment of *LAC*1 gene was cloned from *T. vaporariorum*. Developmental expression profiles revealed that *LAC*1 was expressed in various developmental stages of both species, and its expression level increased gradually in adult stage of *B. tabaci* MEAM1, but showed no significant difference among various developmental stages of *T. vaporariorum*. At the adult stage, the transcript level of *LAC*1 was higher in *B. tabaci* MEAM1 than that in *T. vaporariorum*. Tissue expression profiles revealed that *LAC*1 was expressed in the cephalothorax, midgut and abdomen wreckage of adults of both whiteflies, and showed the highest transcript level in the midgut. The survival rate of *B. tabaci* MEAM1 adults feeding on tomato plants sprayed with SA decreased as the feeding time extended, and was significantly different from that in the control (feeding on tomato plants sprayed with water). At 14 d after adult emergence, the survival rate of *B. tabaci* MEAM1 feeding on tomato plants sprayed with SA was only half the control, while that of *T. vaporariorum* feeding on tomato plants sprayed with SA showed no significant difference from the control. In addition, the expression level of *LAC*1 and the number of eggs laid were higher in *B. tabaci* MEAM1 than those in *T. vaporariorum* regardless of whether they fed on tomato plants sprayed with SA or the control plant.【Conclusion】The results indicate that there are differences in the expression patterns of *LAC*1 between *B. tabaci* MEAM1 and *T. vaporariorum*, and this may play a role in the competition between the two species.

Key words: *Bemisia tabaci* MEAM1; *Trialeurodes vaporariorum*; laccase-1; expression profile; qPCR

漆酶(laccase, EC 1.10.3.2)属于蓝多铜氧化酶(blue multi-copper oxidases, BMCOs)家族,能利用铜离子特有的氧化还原能力氧化有毒的酚类物质,同时将分子氧还原成水(赵丹等, 2011)。漆酶是人类最早发现的酶类之一,其研究已有 100 多年的历史(许颖和兰进, 2005)。漆酶广泛分布于高等植物、昆虫、真菌分泌物和少量细菌中,不同来源的漆酶结构各异,因此催化特性相差较大,催化氧化作用也有差别(Claus, 2004; 高玉千等, 2011)。目前昆虫漆酶研究的还相对较少,通过在烟草天蛾 *Manduca sexta*、稻黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*、黄肢散白蚁 *Reticulitermes flavipes* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中的研究发现,漆酶-1 (laccase-1, LAC1)主要在昆虫的唾液腺、中肠和马氏管中的表达量较高(Dittmer *et al*., 2004; Hattori *et al*., 2005; Gorman *et al*., 2008)。昆虫体内的漆酶-1,可能参与昆虫取食过程中的金属离子代谢、消化木质素、降解植物次生有毒物质以及免疫防御等生理活动,对昆虫的生长发育有着重要作用(Wang *et al*., 2004; Coy *et al*., 2010; Hattori *et al*., 2010)。我们实验室前期研究表明,LAC1 在烟粉虱响应植物的防御反应过程中发挥重要作用,参与烟粉虱-植物的互作(Yang *et al*., 2017)。

烟粉虱 *Bemisia tabaci* MEAM1 隐种(以往称“B 型烟粉虱”)和温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)均属于半翅目(Hemiptera)粉虱科(Aleyrodidae),为广泛分布的世界性害虫(向玉勇等, 2003; Wan and Yang, 2016)。烟粉虱和温室粉虱形态相似、生活习性相近,成虫和若虫均聚集于叶片背面刺吸植物汁液,使受害叶片萎蔫甚至枯死,还可分泌大量蜜露污染叶片和果实,诱发煤污病,影响寄主植物的光合作用,引起植物生理异常;此外还能传播植物病毒,常混合发生(Gill, 1992; Chu and Henneberry, 1998; 万方浩等, 2002; Jones, 2003)。两种粉虱的寄主偏好性有差异,在相同的偏好植物上存活率和生殖能力也存在差异(曹凤勤等, 2008;

黄红，2013）。已有研究对这两种粉虱唾液中的碱性磷酸酶、多酚氧化酶、过氧化物酶和体内的解毒酶系进行了鉴定和比较（雷芳等，2006；张桂芬等，2008；Yan *et al*.，2011；Peng *et al*.，2013）。本研究期望通过酶活力测定、基因克隆、荧光定量 PCR 等技术，能更深入地研究昆虫体内酶类物质在其寄主适应性和生存竞争方面所起的作用。

水杨酸是植物体内一种重要的信号物质，在植物抵御外界胁迫中发挥着重要作用。外源水杨酸可以引起植物一系列的代谢和生理反应，从而影响植物的生长发育（Hayat *et al*.，2010）。外源水杨酸和乙酰水杨酸能够诱导病程相关蛋白（pathogenesis-related protein）基因的表达，引起植物防御反应，这种现象在单子叶和双子叶植物中都有报道（Makandar *et al*.，2006；Thiruvengadam *et al*.，2016）。

本研究在已经获得的烟粉虱 MEAM1 隐种的漆酶-1 基因 cDNA 序列全长（杨春红等，2013）的基础上，检测了烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱的唾液中是否含有漆酶-1，然后克隆温室粉虱的漆酶-1 基因片段，并对漆酶-1 基因在这两种粉虱体内的时空表达情况和在烟粉虱应对植物防御反应过程中所起作用的差异进行了分析；通过研究粉虱取食外施水杨酸的植物后漆酶-1 基因表达的变化，来比较研究和明确漆酶-1 基因在粉虱对植物防御反应的响应过程中所起的作用；通过比较 *LAC*1 在这两种粉虱中的表达差异，来探讨其在这两种粉虱竞争取代过程中可能存在的功能。

1　材料与方法

1.1　昆虫

烟粉虱 *B. tabaci* MEAM1 隐种和温室粉虱 *T. vaporariorum* 为本实验室在温室中的长期饲养种群，寄主植物为番茄 *Lycopersicon esculentum*，cv. Zhongza 9，无用药史。温室饲养温度 25 ± 3℃，相对湿度 40% ~60%，自然光照。

1.2　漆酶酶活力测定

选择用番茄植株饲养的两种粉虱较活跃成虫个体作为供试虫源，随机各取 200 头，放入两端通透的玻璃管（直径 3 cm，高 8 cm）中，玻璃管上端用双层 Parafilm 膜覆盖，进行人工饲养，两层 Parafilm 膜间加入 200 μL 饲养液［10% 蔗糖加 10 mmol/L 2-(N-吗啉基）乙磺酸（2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid，MES］（Amresco 公司，美国）用蒸馏水溶解的混合液）。另将无粉虱取食的饲养液作为对照。

3-乙基苯并噻唑-6-磺酸［2，2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate，ABTS］（Amresco 公司，美国）作为底物来测定漆酶酶活力是迄今为止测定漆酶酶活力较合理和科学的方法（林俊芳等，2009），所以本实验用 ABTS 测定两种粉虱唾液中的漆酶-1 活力。待粉虱取食 24 h 后，使用一次性注射器回收含有粉虱唾液的饲养液和未经烟粉虱取食的饲养液，吸取过程需谨防底膜破裂。反应在 28℃ 下进行，取回收液 50 μL，加到 96 孔微孔板中，然后加入用 100 mmol/L NaAc 溶液配制的 150 μL 2.0 mmol/L 的 ABTS 溶液（pH 5.0），在 240 nm 下测定吸光值，采用动力学方法，每 5 min 读数 1 次，总共读2 h。各处理 200 头重复 3 次，每次重复制备酶液。酶活性以单位时间内每升溶液的吸光度变化值来表示（$\triangle OD_{240}$/min · L）。

1.3　温室粉虱 *LAC*1 cDNA 克隆

随机取 200 头同一时期的温室粉虱成虫，用 RNAeasyMini Kits（Qiagen）试剂盒提取总 RNA，使用北京全式金公司的 TransScript™ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 进行反转录。利用昆虫 *LAC*1 的保守区域设计简并引物 TvLAC1F（5′-TAYGGTCCAGGCRTGTGKAG-3′）和 TvLAC1R（5′-CTGASCAGTGADGTTGCTTC-3′），进行 PCR 扩增，PCR 反应体系（20 μL）：模板 cDNA 1.0 μL，Primer-F/R（10 μmol/L）各 0.5 μL，10 × *TransStart Taq* buffer 2.0 μL，dNTP（10 μmol/L）0.8 μL，*TransStart Taq* DNA Polymerase 0.4 μL，加 ddH_2O 至 20 μL。反应条件：94℃ 预变性 3 min；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 10 min。PCR 扩增产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后，将目的条带按照 TIANgel Midi Purification Kit 的说明进行纯化回收，并连接到 pEASY-T3 载体中，转化 Trans-T1 感受态细胞，蓝白斑筛选，挑取阳性克隆，送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

1.4　荧光定量 PCR 检测 *LAC*1 时空表达模式

分别收集烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱的 2，3，4 龄若虫和羽化后 0，4，7，10 和 14 d 的成虫各 200 头，提取 RNA，用于测定不同发育阶段 *LAC*1 的相对表达量。分别收集两种粉虱羽化后 0，4，7，10 和 14 d 的成虫各 200 头解剖后用于不同发育阶段不同组织 *LAC*1 相对表达量的测定，具体步骤如下：在 DEPC 水配制的 PBS 缓冲液中解剖成虫获得头和前胸（作为一个样品）、中肠（作为一个样品）并收集

腹部残骸(作为一个样品),将解剖出的头胸、中肠清洗后收集于含提取液的 RNAase Free 离心管中用于 RNA 提取,或保存在 -80℃ 冰箱中备用。采用 RNAeasyMini Kits(Qiagen)试剂盒提取总 RNA。提取的 RNA 需经过浓度和质量测定,取等质量的 RNA(本实验由于中肠的 RNA 较难收集,统一选取 RNA 质量为 0.2 μg)进行反转录实验,使用北京全式金公司的 TransScript™ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix,按说明书操作。每实验设 3 次生物学重复,每重复使用 200 头成虫或若虫。

因克隆得到的温室粉虱 *LAC*1 和烟粉虱 MEAM1 隐种 *LAC*1 序列相似性极高,利用其相同序列部分设计荧光定量 PCR 引物(F: 5′-AACGGCAAAGGACGCTACAAGG-3′; R: 5′-CTGACCAGTGAGGTTGCTTCTT-3′)。以 *β-actin*(F: 5′-TCACCACCACAGCTGAGAGA-3′; R: 5′-CTCGTGGATACCGCAAGATT-3′)为内参基因,以初羽化烟粉虱 MEAM1 隐种中肠的 *LAC*1 含量为基准量,采用比较 Ct 值的相对定量方法对 *LAC*1 在不同时间不同组织相对表达量表达进行分析。整头虫不同发育时期的荧光定量 PCR 则以两种粉虱 2 龄若虫的 *LAC*1 表达量为基准。荧光定量 PCR 反应采用 Quantity PCR Kit(Bio-Rad)试剂盒,反应体系为 20 μL。荧光定量 PCR 反应用两步法标准程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 32 s, 38 个循环。反应在 7500 Real-Time PCR System (ABI)上进行。每实验设 3 次生物学重复,每个重复使用 200 头成虫或若虫。

1.5 外施水杨酸处理番茄植株对两种粉虱体内 LAC1 基因相对表达量及成虫存活率和产卵量的影响

1.5.1 番茄植株外施水杨酸的处理:待番茄幼苗长至约 20 ~ 30 cm (5 - 6 叶期),喷施浓度为 0.5 mmol/L 的水杨酸(salicylic acid, SA),每次喷至叶片全湿润,以喷施蒸馏水的番茄植株作为对照,24 h 后接初羽化成虫。

1.5.2 *LAC*1 mRNA 相对表达量变化测定:将两种粉虱分别接到水杨酸处理的植株或对照植株上饲喂,在 0, 1, 4, 7, 10 和 14 d 分别取 200 头,提取 RNA,反转录后按照 1.4 节所列方法进行荧光定量 PCR。

1.5.3 烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱产卵量和存活率观察:分别将一对初羽化的烟粉虱 MEAM1 隐种/温室粉虱接到水杨酸处理 24 h 的叶片上,每株接一片叶,用微虫笼将叶片罩住,共接 30 对。然后将接好虫的寄主植物放置在人工气候箱中培养,控制条件为温度 25 ± 1℃,相对湿度 60% ~70%,光周期 14L∶10D。每 7 d 调查一次,记载成虫存活率和产卵量。每实验设 3 次生物学重复,每个重复 60 头成虫。喷蒸馏水的清洁番茄植株按上述方法处理作为对照。

1.6 数据分析

利用比较阈值法来测定目的基因的相对表达量,即目的基因的相对表达量 = $2^{-\triangle\triangle Ct}$,用 SAS 8.01 (SAS, 美国)统计软件的独立样本 *T* 检验、方差分析(ANOVA)来进行数据的统计分析,采用 LSD 法多重比较检验,显著性检验水平为 $P = 0.05$。用 Sigmaplot 12.0(Systat, 美国)作图。

2 结果

2.1 烟粉虱 MEAM1 隐种与温室粉虱唾液中漆酶-1 酶活力比较

ABTS 在 25℃、pH 5 时仅与漆酶-1 反应,因此唾液中加 ABTS 测得的结果为漆酶-1 活力。测定结果显示(图 1)虽然温室粉虱中漆酶-1 活力略高于烟粉虱 MEAM1 隐种,但经 *T* 检验得出温室粉虱与烟粉虱 MEAM1 隐种漆酶-1 酶活力不存在显著差异。

2.2 温室粉虱 *LAC*1 基因克隆

PCR 扩增后得到温室粉虱 *LAC*1 基因大小 639 bp 的中间片段,对扩增条带回收测序后进行 Blast 搜索,结果发现与来自其他昆虫的 *LAC*1 基因高度相似(图 2),推测所得片段是温室粉虱 *LAC*1 基因 cDNA 片段。利用 SMART 软件分析得到,温室粉虱 *LAC*1 片段的编码蛋白具有保守氨基酸序列 HFWHSH,其中 3 个组氨酸残基(H)是铜离子结合位点;具有引物酶解旋酶的锌结合域;有 2 个 N-糖基化位点,说明漆酶-1 可能会发生特定的糖基化修饰。

2.3 *LAC*1 在烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱体内的时空表达

2.3.1 *LAC*1 在不同发育阶段的表达:结果如图 3 所示,两种粉虱 2, 3 和 4 龄若虫和初羽化的成虫 *LAC*1 表达量均相对较低,且无显著性差异;烟粉虱 MEAM1 隐种成虫中表达量较高,从初羽化至羽化后 14 d,表达量呈现逐渐升高的趋势,且差异显著;*LAC*1 在温室粉虱各个发育阶段的表达量无显著差异。烟粉虱 MEAM1 隐种在羽化后 7, 10 和 14 d 时 *LAC*1 的表达量显著高于温室粉虱。这表明在若虫期和成虫发育前期,烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱 *LAC*1 的表达没有显著差异,但到了成虫发育后期两者表达量差距有越来越大的趋势。

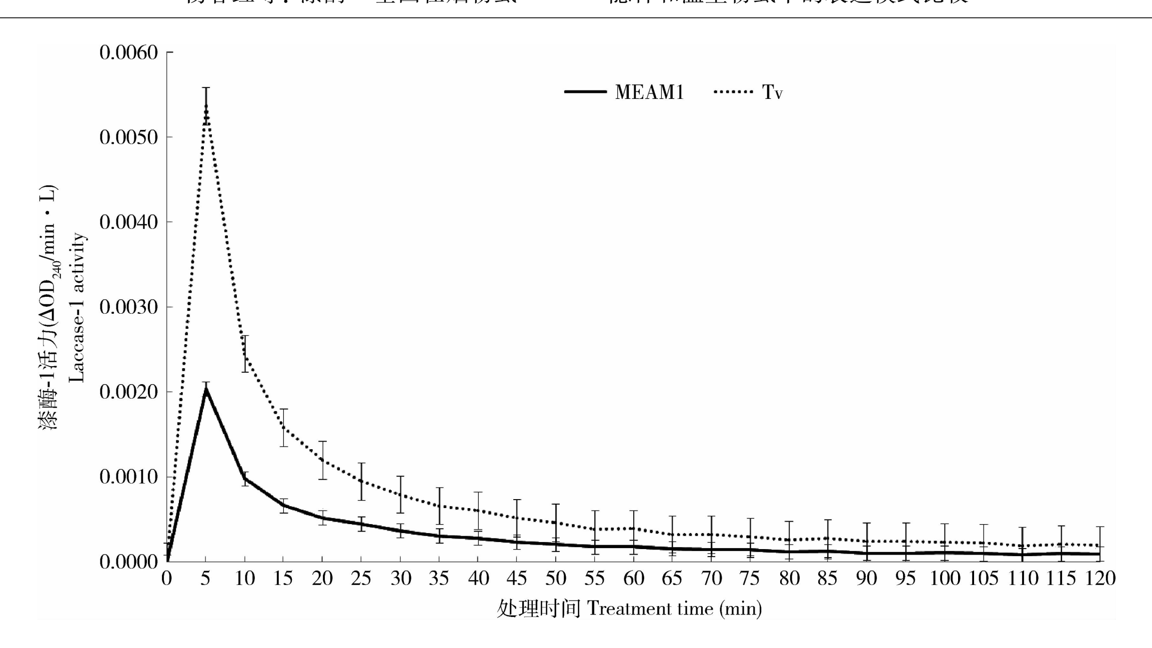


图 1　烟粉虱 MEAM1 隐种与温室粉虱唾液漆酶-1 酶活力比较

Fig. 1　Comparison of laccase-1 activity in saliva secreted by *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum*

Tv：温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*. 图中数据为平均值 ± 标准误。Data in the figure are mean ± *SE*.

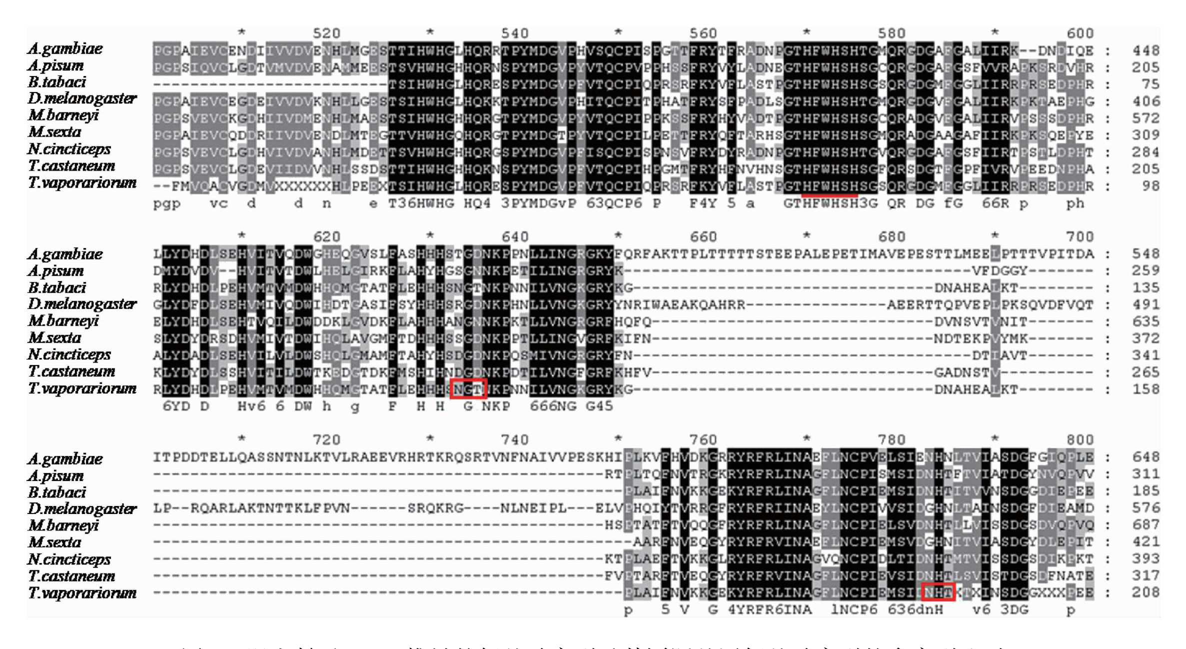


图 2　温室粉虱 *LAC*1 推导的氨基酸序列及其同源基因氨基酸序列的多序列比对

Fig. 2　Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of *LAC*1 from *Trialeurodes vaporariorum* and its homologues from other insects

以 Clustal X 进行多序列比对，用 Genedoc 作图；黑色阴影表示相同氨基酸，灰色阴影表示相似氨基酸。保守序列以下划线标记，N-linked 糖基化位点（N-X-T）以方框标记。Multiple sequence alignment is conducted with Clustal X and the graph is drawn with Genedoc. The identical and similar residues are shaded in black and gray, respectively. The conservative sequence is underlined. N-linked glycosylation (N in N-X-T) are boxed. 漆酶-1 基因序列来源及 GenBank 登录号 The origin of LAC1 genes and their GenBank accession numbers：*A. gambiae*：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*，AAN17505.1；*A. pisum*：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*，XP_001948070.1；*B. tabaci*：烟粉虱 *Bemisia tabaci*，JQ966215；*D. melanogaster*：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*，NP_609287.3；*M. barneyi*：黄翅大白蚁 *Macrotermes barneyi*，AFD33366.1；*M. sexta*：烟草天蛾 *Manduca sexta*，AAN17506.1；*N. cincticeps*：黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps*，BAJ06132.1；*T. castaneum*：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*，NP_001034514.1；*T. vaporariorum*：温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*.

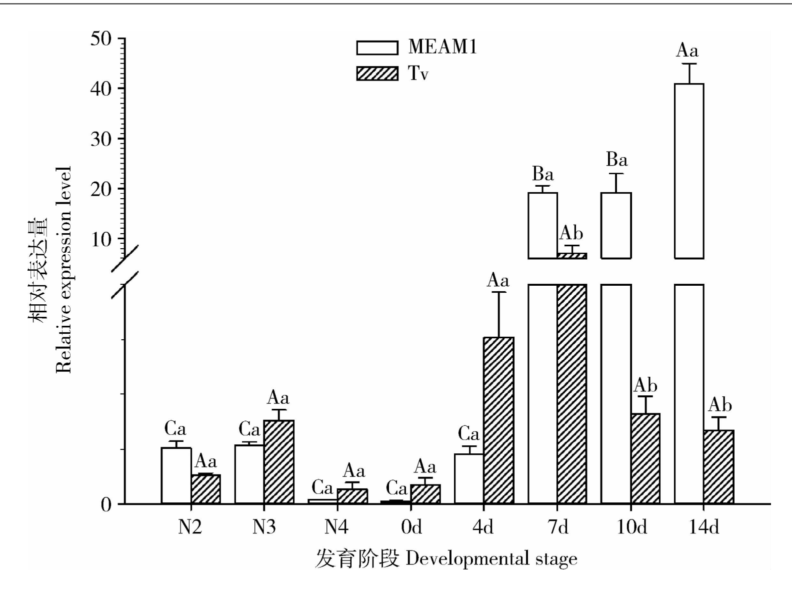


图 3　烟粉虱 MEAM1 隐种与温室粉虱不同发育时期 *LAC*1 mRNA 的表达谱

Fig. 3　Expression profiles of *LAC*1 mRNA in *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum* at different developmental stages

Tv：温室粉虱 *T. vaporariorum*；N2，N3：分别为 2 和 3 龄若虫 2nd and 3rd instar nymph，respectively；N4：伪蛹期 Pseudo pupal stage；0d：初羽化成虫 Newly emerged adult；4d：4 日龄成虫 4 d-old adult；7d：7 日龄成虫 7 d-old adult；10d：10 日龄成虫 10 d-old adult；14d：14 日龄成虫 14 d-old adult. 图中数据以 2 龄若虫中 *LAC*1 表达量为基准量。图中数据为平均值 ± 标准误；寄主种类和发育阶段作为两个因素，柱上不同大写字母表示相同种粉虱不同发育阶段基因表达量差异显著，不同小写字母表示相同发育阶段的两种间基因表达量差异显著（two-way ANOVA，$P<0.05$）。*β-actin* 作为内参。Data were calibrated according to the mRNA level of *LAC*1 in the 2nd instar nymph. Data in the figure are mean ± *SE*. Host species（*B. tabaci* MEAM1 and *T. vaporariorum*）and developmental stage（nymphal instars and adult emergence time）were taken as two factors, different capital letters above bars represent significant difference in relative transcript level among different developmental stages of the same species, while different lowercase letters represent significant difference in the relative transcript level between the two species at the same developmental stage（two-way ANOVA，$P<0.05$）. *β-actin* was used as an internal reference gene.

2.3.2　*LAC*1 在成虫不同组织中的表达：*LAC*1 在烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱成虫不同组织中的表达差异和不同龄期的表达趋势如图 4 所示，*LAC*1 在两种粉虱的头胸部、中肠和腹部残骸中均有表达，且表达量有显著差异；无论是烟粉虱 MEAM1 隐种还是温室粉虱，中肠中 *LAC*1 的表达量均高于头胸部和腹部残骸；绝大部分发育龄期，温室粉虱头胸部和中肠中 *LAC*1 的表达量均显著高于烟粉虱 MEAM1 隐种，在羽化后 4 d，温室粉虱头胸部中 *LAC*1 的表达量是烟粉虱 MEAM1 隐种中的近 6 倍，羽化后 7 d，温室粉虱中肠中 *LAC*1 的表达量是烟粉虱 MEAM1 隐种中肠中表达量的近 10 倍；烟粉虱 MEAM1 隐种腹部残骸中 *LAC*1 的表达量显著高于温室粉虱，特别是在成虫羽化 14 d 时，*LAC*1 在烟粉虱 MEAM1 隐种中的表达量比温室粉虱高了近 9 倍。

2.4　水杨酸处理番茄植株对烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱漆酶-1 基因相对表达量及成虫存活率和产卵量的影响

与对照相比，取食水杨酸处理的植株后烟粉虱 MEAM1 隐种 *LAC*1 的相对表达量在羽化后 1 d 和 4 d的成虫中无显著差异，从羽化后 7 d 开始显著下降；温室粉虱 *LAC*1 相对表达量在取样的几个时间点取食外施水杨酸或是对照植株均无显著差异（图 5）。结果显示，从羽化后 7 d 开始，无论是取食外施水杨酸的植株还是取食对照植株，烟粉虱 MEAM1 隐种的 *LAC*1 表达量始终显著高于温室粉虱。

随取食外施水杨酸植株时间的延长，烟粉虱 MEAM1 隐种成虫存活率下降，与对照相比差异显著，在羽化 14 d 时，取食外施水杨酸植株的烟粉虱 MEAM1 隐种存活率仅为对照的一半，而取食外施水杨酸植株的温室粉虱成虫的存活率与对照相比差异不显著（图 6：A）。取食外施水杨酸植株的烟粉虱 MEAM1 隐种产卵量显著减少，而温室粉虱取食外施水杨酸的植株与取食正常植株相比产卵量差异不显著（图 6：B）。无论是取食正常植株还是外施水杨酸植株，烟粉虱 MEAM1 隐种的产卵量均高于温室粉虱。

3　讨论

基因在生物体中的表达规律与其功能有密切的联系。*LAC*1 在烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱的

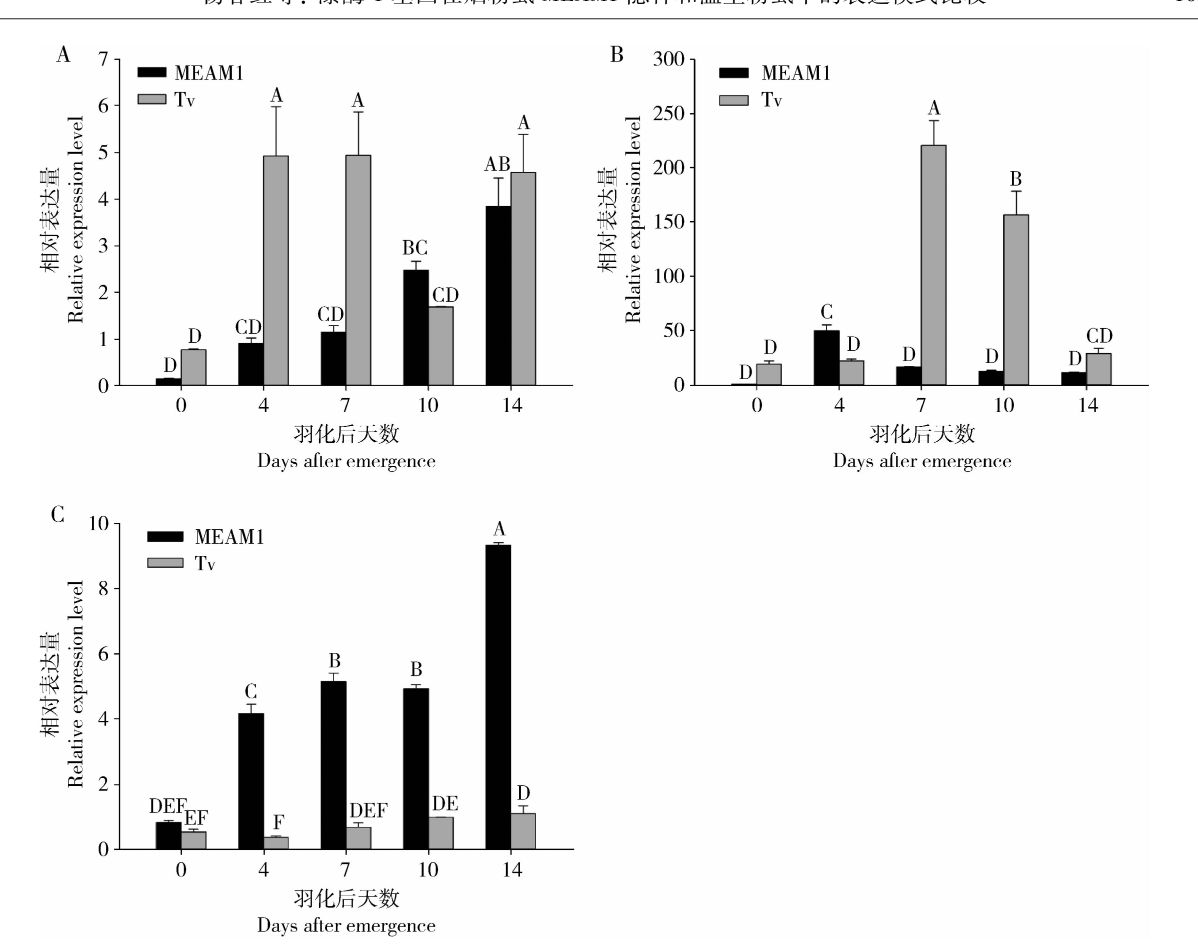


图 4　烟粉虱 MEAM1 隐种与温室粉虱羽化不同天数的成虫头胸部（A）、中肠（B）和腹部残骸（C）中 *LAC*1 mRNA 的表达谱

Fig. 4　Expression profiles of *LAC*1 mRNA in cephalothorax (A), midgut (B) and abdomen wreckage (C) of *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum* adults at different day-old

Tv：温室粉虱 *T. vaporariorum*. 图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同字母表示同一组织中的表达量在不同日龄成虫间存在显著差异（$P < 0.05$）（LSD 多重比较检验）。Data in the figure are mean ± *SE*. Different letters above bars represent significant difference in relative expression level in the same tissue among adults at different day-old at the 0.05 level (LSD multiple comparison test).

不同组织中和不同发育阶段均有表达，其在时间和空间上分布的广泛性说明 *LAC*1 在两种粉虱体内可能发挥着重要作用。本研究发现 *LAC*1 在烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱成虫的头胸部、中肠和腹部残骸中均有表达，头胸部含有唾腺组织，而腹部残骸主要由马氏管、脂肪体和表皮组成，推测粉虱的唾腺、马氏管、脂肪体中可能都有 *LAC*1 的表达。无论是烟粉虱 MEAM1 隐种还是温室粉虱，*LAC*1 在中肠中特异性高表达，说明漆酶-1 可能在中肠中发挥主要的作用。

本研究证实了烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱的唾液腺能分泌漆酶-1，存在于水状唾液中。在番茄植株上长期饲养的烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱种群唾液中的漆酶-1 酶活力无显著差异。荧光定量 PCR 结果表明，大部分发育时期，温室粉虱头胸部 *LAC*1 的相对表达量略高于烟粉虱 MEAM1 隐种。郑长英等（2012）的研究发现，在茄子、烟草、黄瓜和番茄 4 种植物中，取食番茄叶的烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱存活率均为最低，因此番茄不是两种粉虱的最佳寄主植物。罗晨等（2007）研究发现，温室粉虱在番茄上的存活率大于烟粉虱 MEAM1 隐种。同样是取食非最佳适生性寄主，温室粉虱的中肠中漆酶基因表达量高于烟粉虱 MEAM1 隐种，中肠作为消化吸收食物的主要场所，温室粉虱用更多的漆酶来降解有毒物质，这可能是其在番茄上存活率比烟粉虱 MEAM1 隐种高的原因之一。

前期研究发现，外施茉莉酸（JA）诱导的植物防御反应能使 *LAC*1 的表达量升高，而且 RNAi 干扰 *LAC*1 后烟粉虱在番茄植株上的存活率显著下降，而不影响其在人工饲料上的存活（Yang *et al*., 2017），Zhang 等（2018）也证明在麦长管蚜 *Sitobion avenae* 中发现沉默*LAC*1显著降低了麦长管蚜在抗蚜小麦

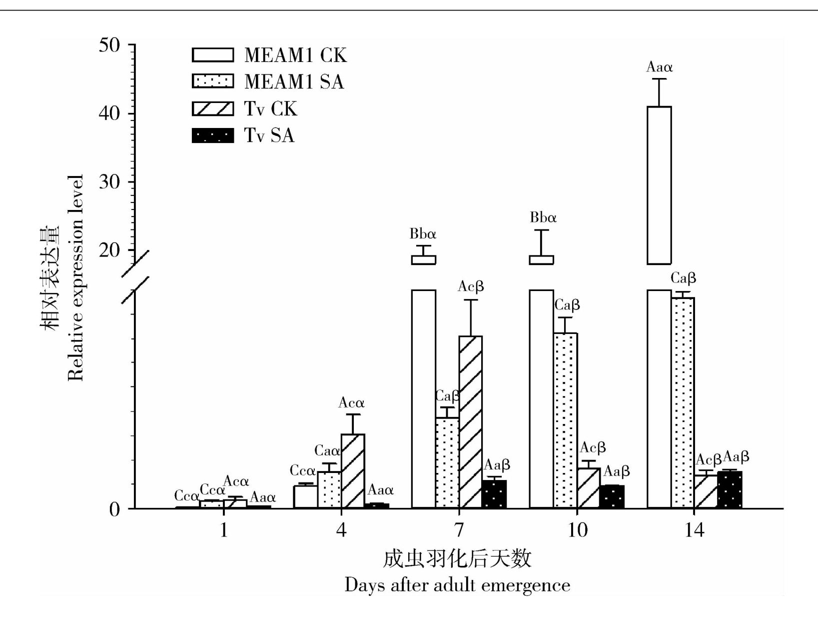


图 5 取食外施水杨酸的番茄植株后烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱不同日龄成虫 *LAC*1 mRNA 的表达谱

Fig. 5 Expression profiles of *LAC*1 mRNA in *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum* adults at different day-old after feeding on tomato plants sprayed with salicylic acid

Tv：温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*；SA：外施水杨酸的番茄植株 Tomato plants sprayed with salicylic acid；CK：喷施蒸馏水的番茄植株 Tomato plants sprayed with distilled water. 柱上不同大写字母表示相同种不同处理不同日龄成虫间基因表达量差异显著，不同小写字母表示相同处理下不同日龄两种间的基因表达量差异显著，不同希腊字母表示相同日龄不同处理两种间基因表达量差异显著（three-way ANOVA, $P<0.05$）。Different capital letters above bars represent significant difference in relative transcript level among different day-old adults of the same species subjected to different treatments, different small letters represent significant difference in the relative transcript level among different day-old adults between the two species subjected to the same treatment, and different Greek letters represent significant difference in relative transcript level in adults between the two species at the same day-old subjected to different treatments (three-way ANOVA, $P<0.05$).

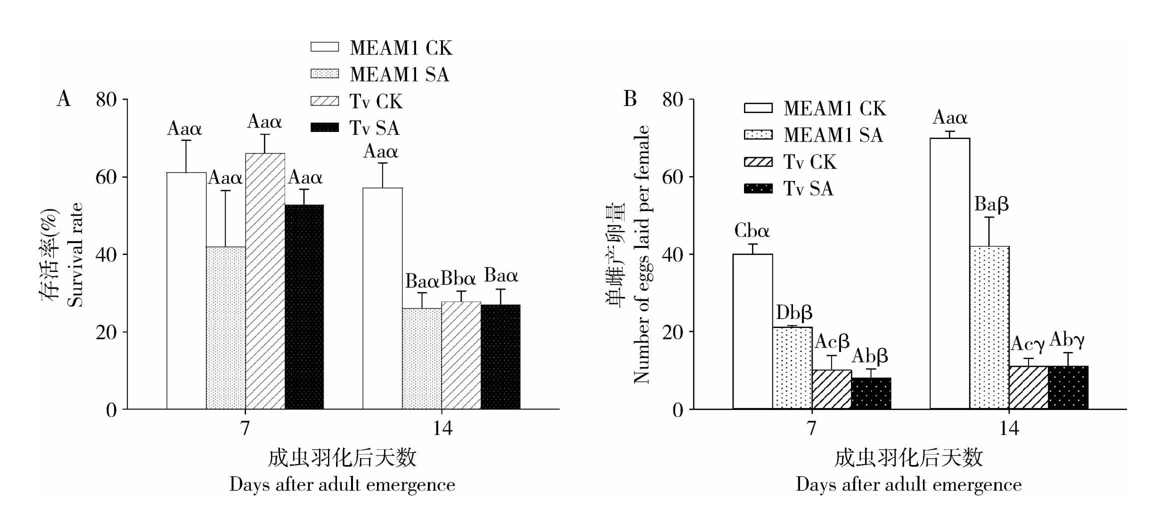


图 6 取食外施水杨酸的番茄植株后烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱不同日龄成虫存活率（A）和产卵量（B）

Fig. 6 Survival rate (A) and the number of eggs laid (B) of *Bemisia tabaci* MEAM1 and *Trialeurodes vaporariorum* adults at different day-old after feeding on tomato plants sprayed with salicylic acid

Tv：温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*；SA：外施水杨酸的番茄植株 Tomato plants sprayed with salicylic acid；CK：喷施蒸馏水的番茄植株 Tomato plants sprayed with distilled water. 柱上不同大写字母表示相同种不同处理不同日龄成虫间基因表达量差异显著，不同小写字母表示相同处理下不同日龄两种间的基因表达量差异显著，不同希腊字母表示相同日龄不同处理两种间基因表达量差异显著（three-way ANOVA, $P<0.05$）。Different capital letters above bars represent significant difference in relative transcript level among different day-old adults of the same species subjected to different treatments, different small letters represent significant difference in the relative transcript level among different day-old adults between the two species subjected to the same treatment, and different Greek letters represent significant difference in relative transcript level in adults between the two species at the same day-old subjected to different treatments (three-way ANOVA, $P<0.05$).

上的存活率，说明 *LAC*1 参与昆虫的反防御反应。外源水杨酸（SA）可使植物产生诱导抗性（Smith *et al.*, 2009），取食外施水杨酸诱导的植物，使烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱的 *LAC*1 相对表达量下降，说明水杨酸诱导的植物抗性机制对昆虫 *LAC*1 的表达产生影响，JA 和 SA 具有拮抗作用，SA 能抑制 JA 的合成及 JA 诱导的基因表达（李国婧和周燮，2002），此研究表明 *LAC*1 能被 JA 正调控，而被 SA 负调控。烟粉虱 MEAM1 隐种 *LAC*1 表达量下降的幅度高于温室粉虱，可能是由于烟粉虱 MEAM1 隐种对于这种植物的抗虫机制比温室粉虱更敏感。*LAC*1 在两种粉虱体内作用能力的不同可能是两者反防御能力存在差异的原因之一，温室粉虱在中肠中 *LAC*1 表达量更高，对水杨酸诱导的植物的防御机制的应对能力更强，所以较不敏感。

随着取食外施水杨酸植株的时间的延长，与对照相比，烟粉虱 MEAM1 隐种存活率显著下降，温室粉虱存活率差异不显著；烟粉虱 MEAM1 隐种产卵量显著减少，而温室粉虱也无显著差异。此结论验证了前面的推论，烟粉虱 MEAM1 隐种对于植物的抗性机制更敏感，从而存活率下降、产卵量减少，而温室粉虱较不敏感，因此植物的抗性对其寿命和产卵量影响不大。水杨酸诱导的植物抗性使烟粉虱 MEAM1 隐种 *LAC*1 表达量迅速下降，因为 LAC1 具有降解番茄植株汁液中有毒物质的功能，*LAC*1 的表达量减少使烟粉虱 MEAM1 隐种的解毒能力降低，从而烟粉虱 MEAM1 隐种死亡率上升，产卵量减少。温室粉虱较不敏感，取食外施 SA 的植株后 *LAC*1 表达量与对照无显著差异，从而对其取食和生存影响不大。可能正是由于 *LAC*1 的稳定表达使温室粉虱的寿命和产卵量受植物防御物质的影响减小。

无论是取食外施水杨酸的植株还是正常植株，烟粉虱 MEAM1 隐种体内总的 *LAC*1 表达量均高于温室粉虱，所以烟粉虱 MEAM1 隐种利用 *LAC*1 的解毒能力可能强于温室粉虱。在正常取食的情况下，烟粉虱 MEAM1 隐种比温室粉虱的寿命更长，产卵量更高，但在植物产生防御反应即不利的取食情况下，与温室粉虱相比烟粉虱 MEAM1 隐种死亡率较高，但其产卵量依然显著高于温室粉虱，所以其具有一定的竞争取代优势。由本研究得出 *LAC*1 在烟粉虱 MEAM1 隐种和温室粉虱中的表达模式是不同的，*LAC*1 在温室粉虱中表达比较稳定，不受发育时期和取食外施水杨酸植株的影响，而 *LAC*1 在烟粉虱 MEAM1 隐种中的表达量在成虫期呈现逐渐升高的趋势，而且取食外施水杨酸的植株后表达量下降，同时取食外施水杨酸植株后烟粉虱 MEAM1 隐种的产卵量和存活率显著下降，说明 LAC1 在烟粉虱的生命活动中发挥更加重要的作用。

参考文献（References）

Cao FQ, Liu WX, Wan FH, Cheng LS, 2008. Behavior selection of *Bemisia tabaci* B biotype to different host plants and colors. *Chin. Bull. Entomol.*, 45(3): 431–436. [曹凤勤, 刘万学, 万方浩, 程立生, 2008. 寄主挥发物、叶色在 B 型烟粉虱寄主选择中的作用. 昆虫知识, 45(3): 431–436]

Chu CC, Henneberry TJ, 1998. Arthropod management: development of a new whitefly trap. *J. Cotton Sci.*, 2(3): 104–109.

Claus H, 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 5 (1–2): 93–96.

Coy MR, Salem TZ, Denton JS, Kovaleva, ES, Liu Z, Barber DS, Campbell JH, Davis DC, Buchman GW, Boucias DG, Scharf ME, 2010. Phenol-oxidizing laccases from the termite gut. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(10): 723–732.

Dittmer NT, Suderman RJ, Jiang H, Zhu YC, Gorman MJ, Kramer KJ, Kanost MR, 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 34(1): 29–41.

Gao YQ, Zhang LM, Zhang SM, Xu SX, Wu K, 2011. Research progress of fungal laccase structure. *J. Food Sci. Biotechnol.*, 30 (2): 166–171. [高玉千, 张利明, 张世敏, 徐淑霞, 吴坤, 2011. 真菌漆酶高级结构研究进展. 食品与生物技术学报, 30 (2): 166–171]

Gill R, 1992. A review of the sweetpotato whitefly in southern California. *Pan-Pac. Entomol.*, 68(2): 144–152.

Gorman MJ, Dittmer NT, Marshall JL, Kanost MR, 2008. Characterization of the multicopper oxidase gene family in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 38(9): 817–824.

Hattori M, Konishi H, Tamura Y, Konno K, Sogawa K, 2005. Laccase-type phenoloxidase in salivary glands and watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *J. Insect Physiol.*, 51(12): 1359–1365.

Hattori M, Tsuchihara K, Noda H, Konishi H, Tamura Y, Shinoda T, Nakamura M, Hasegawa T, 2010. Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(4): 331–338.

Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A, 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environ. Exp. Bot.*, 68(1): 14–25.

Huang H, 2013. Biology of *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes ricini* (Hemiptera, Aleyrodidae) on Four Host Plant Species. MSc Thesis, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi. [黄红, 2013. 温室白粉虱、烟粉虱和蓖麻粉虱在四种寄主植物上的生物学研究. 陕西杨凌：西

北农林大学硕士学位论文]

Jones D, 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109(3): 195-219.

Lei F, Zhang GF, Wan FH, Ma J, 2006. Effects of plant species switching on contents and dynamics of trehalose and trehalase activity of *Bemisia tabaci* B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum. Sci. Agric. Sin.*, 39(7): 1387-1394. [雷芳, 张桂芬, 万方浩, 马骏, 2006. 寄主转换对B型烟粉虱和温室粉虱海藻糖含量和海藻糖酶活性的影响. 中国农业科学, 39(7): 1387-1394]

Li GJ, Zhou X, 2002. The "dialogue" mechanism of salicylic acid and jasmonic acid in plant defense reaction. *J. Cell Biol.*, 24(2): 101-105. [李国婧, 周燮, 2002. 植物防御反应中水杨酸与茉莉酸的"对话"机制. 细胞生物学杂志, 24(2): 101-105]

Lin JF, Liu ZM, Chen XY, Guo LQ, Wang J, 2009. Evaluation of assay methods for determining fungal laccase activity. *Chin. J. Bioproc. Engin.*, 7(4): 1-8. [林俊芳, 刘志明, 陈晓阳, 郭丽琼, 王杰, 2009. 真菌漆酶的酶活性测定方法评价. 生物加工过程, 7(4): 1-8]

Luo C, Xiang YY, Guo XJ, Zhang F, Zhang ZL, 2007. Comparative on development and reproduction between *Bemisia tabaci* biotype B and *Trialeurodes vaporariorum* on four species of host-plants. *Acta Ecol. Sin.*, 27(3): 1035-1040. [罗晨, 向玉勇, 郭晓军, 张帆, 张芝利, 2007. 寄主植物对B型烟粉虱(*Bemisia tabaci*)和温室粉虱(*Trialeurodes vaporariorum*)个体发育和种群繁殖的影响. 生态学报, 27(3): 1035-1040]

Makandar R, Essig JS, Schapaugh MA, Trick HN, Shah J, 2006. Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 19(2): 123-129.

Peng L, Yan Y, Yang CH, Barro PJ, Wan FH, 2013. Identification, comparison and functional analysis of salivary phenol oxidising enzymes in *Bemisia tabaci* B and *Trialeurodes vaporariorum. Entomol. Exp. Appl.*, 147(3): 282-292.

Smith JL, Moraes CMD, Mescher MC, 2009. Jasmonate and salicylate mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Manag. Sci.*, 65(5): 497-503.

Thiruvengadam M, Baskar V, Kim SH, Chung IM, 2016. Effects of abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid on the content of phytochemicals and their gene expression profiles and biological activity in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *J. Plant Growth Regul.*, 80(3): 377-390.

Wan FH, Guo JY, Wang DH, 2002. Alien invasive species in China: their damages and management strategies. *Biodivers. Sci.*, 10(1): 119-125. [万方浩, 郭建英, 王德辉, 2002. 中国外来入侵生物的危害与管理对策. 生物多样性, 10(1): 119-125]

Wan FH, Yang NW, 2016. Invasion and management of agricultural alien insects in China. *Annu. Rev. Entomol.*, 61(1): 77-98.

Wang J, Kean L, Yang J, Allan AK, Davies SA, Herzyk P, Dow JA, 2004. Function-informed transcriptome analysis of *Drosophila* renal tubule. *Genome Biol.*, 5(9): R69.

Xiang YY, Li ZZ, Zhang F, Luo C, 2003. Progress of study on *Bemisia tabaci* (Gennadius) and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). *J. Mount. Agric. Biol.*, 23(4): 352-359. [向玉勇, 李子忠, 张帆, 罗晨, 2003. 烟粉虱和温室粉虱的研究进展. 山地农业生物学报, 23(4): 352-359]

Xu Y, Lan J, 2005. Advances in the research of fungal laccase. *Acta Edulis Fungi*, 12(1): 57-64. [许颖, 兰进, 2005. 真菌漆酶研究进展. 食用菌学报, 12(1): 57-64]

Yan Y, Peng L, Liu WX, Wan FH, Harris MK, 2011. Host plant effects on alkaline phosphatase activity in the whiteflies, *Bemisia tabaci* biotype B and *Trialeurodes vaporariorum. J. Insect Sci.*, 11: 9.

Yang CH, Guo JY, Chu D, Ding TB, Wei KK, Cheng DF, Wan FH, 2017. Secretory laccase 1 in *Bemisia tabaci* MED involves in whitefly-plant interaction. *Sci. Rep.*, 7(1): 3623.

Yang CH, Peng L, Guo JY, Yan Y, Wan FH, Wang JJ, 2013. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a laccase-1 gene from *Bemisia tabaci* Middle East-Asia Minor 1 (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Entomol. Sin.*, 56(2): 111-119. [杨春红, 彭露, 郭建洋, 严盈, 万方浩, 王进军, 2013. 烟粉虱MEAM1隐种漆酶-1基因全长cDNA克隆、序列分析与组织表达. 昆虫学报, 56(2): 111-119]

Zhang GF, Lei F, Wan FH, Ma J, Yang YG, 2008. Effects of plant species switching on dynamics of amylase and proteinase activity of *Bemisia tabaci* biotype B and *Trialeurodes vaporariorum. Biodivers. Sci.*, 16(4): 313-320. [张桂芬, 雷芳, 万方浩, 马骏, 杨玉国, 2008. 寄主植物转换对B型烟粉虱和温室粉虱淀粉酶及蛋白酶活性的影响. 生物多样性, 16(4): 313-320]

Zhang Y, Fan J, Francis F, Chen J, 2018. Molecular characterization and gene silencing of Laccase 1 in the grain aphid, *Sitobion avenae. Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 97(4): e21446.

Zhao D, Wang Y, Zhao M, 2011. Bioelectrochemistry of laccase. *Prog. Chem.*, 23(6): 1224-1236. [赵丹, 王炎, 赵敏, 2011. 漆酶的生物电化学研究. 化学进展, 23(6): 1224-1236]

Zheng CY, Sun LJ, Zhang AX, Wang YH, 2012. Study on adaptability of *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* to host plants in Shandong Province. *J. Agric.*, 2(7): 33-36. [郑长英, 孙丽娟, 张爱霞, 王雅卉, 2012. 山东省烟粉虱和温室白粉虱对寄主植物的适应性. 农学学报, 2(7): 33-36]

(责任编辑: 马丽萍)